结合 SADF 与 RAPD 标记构建家蚕连锁图

何宁佳*，鲁 成**，李 斌，周泽扬，向仲怀
（西南农业大学蚕桑丝绸学院，农业部蚕桑学重点开放实验室，重庆 400716）

摘要：用 40 个选择性扩增多态性引物和 137 个随机性扩增多态性引物对家蚕 *Bombyx mori* F_2 群体进行分子标记的筛选。获得 544 个符合遗传分离比的多态性位点，并用 Mapmaker 软件进行连锁分析。在最小 LOD 值为 4，最大重组值为 0.2 条件下拆分连锁群，并对处于同一连锁群的位点进行合理排序，计算出位点间的重组值后转换为图谱距离，构建了一个家蚕的分子连锁图。

关键词：家蚕；分子标记；连锁图；遗传

中图分类号：Q755 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）04-0476-07

连锁图的构建，是遗传学基础性研究中的一个重要领域，是基因分析的重要方面，同时能为育种工作提供指导，是当今遗传学研究的热点之一。分子连锁图也是遗传学基础理论研究与实际应用之间的重要桥梁。它能对控制品质的数量基因和抗病基因进行分析、定位；能通过分子标记进行选择，快速制定出富有成效的育种计划；能够借助分子连锁图提供的指导进行基因克隆和外源基因导入等方面的研究[1]。在这方面，家蚕 *Bombyx mori* 是应用得较为广泛的昆虫材料，它拥有丰富的遗传多样性，为遗传连锁图的构建奠定了良好的基础。1990 年由美国的 Goldsmith 提出一个称之为“国际蚕计划”的设想，计划用 300 个限制性内切酶多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）标记，获得间隔均达到 10 cM（图谱距离，centimorgan）的连锁图[2]。1995 年日本东京大学的 Promboon 等[3]用随机扩增多态性（random amplified polymorphism DNA，RAPD）技术对家蚕品种 C_{108} 和 P_{50} 以及它们杂交产生的 F_2 代个体进行了遗传分析，得到 168 个 RAPD 标记。日本蚕丝试验场的 Yasukochi[12]于 1998 年绘制的家蚕分子连锁图集合了 400 多个遗传标记，包括部分形态标记、同工酶标记、RFLP 标记和 RAPD 标记，标记间的平均距离为 10 cM 左右，这是目前标记密度较大的家蚕连锁图。到目前为止，我国家蚕分子连锁图的构建工作尚处在起步阶段。本校农业部蚕桑学重点开放实验室结合我国实情开展了家蚕分子连锁图的构建，现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕材料：C_{108}、大造、大造（♀）与 C_{108}（♂）杂交的 F_1 代以及 F_2 代个体为西南农业

基金项目：国家自然科学基金重点资助项目（39730370）；教育部跨世纪优秀青年基金资助项目
*西南农业大学 98 届博士生，现在湖南师范大学生命科学学院工作
**通讯作者
收稿日期：1999-09-18；接受日期：2000-10-26

大学家蚕基因库提供。

人工合成接头与引物[4]：选择性扩增（selective amplification DNA fragments，SADF）的接头与引物均为中国科学院上海植物生理研究所贝克曼（Becman）生物技术示范实验室合成。

合成 2 条部分互补的寡聚核苷酸链，稀释为 200 mg/mL，于 37℃退火 10 min 至室温，4℃保存备用。该接头包括两部分，一为核心序列（CORE），另一为酶特定序列（ENE）。即 3′—TGCA 能与用 *Pst* Ⅰ酶解的基因组 DNA 片段粘端互补：

§————CORE———— §—ENE—§

SDAF 接头 5′-GACGTGACGGCCGTCATGCA-3′

3′-GCACTGCCGGCAGT-5′

SADF 引物由 3 部分组成，第 1 部分为核心序列（CORE），第 2 部分为酶特定序列（ENE），第 3 部分为 3 个选择碱基（SB），一共合成了 40 个引物，其 3 个选择碱基各不相同。

├——— CORE ———┼ EN　E §—SB—§

引物 1：5′-GACGGCCGTCATGCAGAGG-3′

引物 2：5′-GACGGCCGTCATGCAGACG-3′

主要试剂：T_4-DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim 公司；Taq 酶和 dNTPs 购自 Promega 公司；RAPD 随机引物购自 OPERON 公司（引物的名称编号采用通用的商品名）；PCR 仪为 Tehemolyne Amplitron Ⅰ型 DNA 扩增仪（购于天美公司）。

1.2　方法

家蚕基因组 DNA 的制备：采用稍作改进的 Sambrook[5] 的方法，从 5 龄第 3 天的家蚕后部丝腺中按下列步骤分离提纯家蚕基因组模板 DNA。

酶解连接及其 SADF 模板 DNA 的制备：家蚕基因组 DNA 用 *Pst* Ⅰ酶解与人工接头的连接在同一反应体系中完成。在 20 μL 的反应体系中，含有家蚕基因组 DNA 0.2 ng，接头 0.2 ng，20 单位 *Pst* Ⅰ，2 单位 T_4-DNA 连接酶（Promega 公司产品），1 mmol/L ATP，10 mmol/L Tris-HCl pH 7.8，5 mmol/L DTT，60 mmol/L KCl，1 mmol/L EDTA。在 37℃反应 1 h，20℃ 1 h 为 1 循环，共循环 3 次。用灭菌双蒸水稀释后置 4℃备用。

SADF-PCR 反应体系及扩增程序：参照 Boehringer 公司的 PCR 应用手册进行。反应总体积为 25 μL，含有 50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，0.1% Triton-100，2 mmol/L $MgCl_2$，dNTP、dCTP、dGTP、dTTP 各为 0.2 mmol/L，SADF 引物为 100 ng，模板 DNA 为 0.0064 ~ 4 ng，1 单位的 Taq 聚合酶（Promega 产品）。扩增条件为 94℃变性 0.5 min，56 ~ 62℃退火 1 min，72℃延伸 1.5 min，35 个循环后 72℃链延伸 7 min，扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，经溴乙锭染色后紫外灯下观察拍照。

RAPD-PCR 反应体系及扩增程序：RAPD 扩增反应参照 Williams[6] 和夏庆友[7] 的方法并略加调整，RAPD 反应体系（体积为 25 μL）中含有 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3，500 mmol/L KCl，0.1%Triton-100，2.0 mmol/L $MgCl_2$，dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各为 0.2 mmol/L，随机引物 0.2 mmol/L，模板 DNA 为 10 ~ 20 ng，1 单位 Taq DNA 聚合酶。反应扩增条件为 94℃变性 0.5 min，40℃退火 1 min，72℃延伸 1.5 min，35 个循环之后接 72℃ 7 min。扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳，经溴乙锭染色后紫外灯下观察拍照。

连锁分析：采用 χ^2 检测，去掉那些在5%显著水平上不符合3∶1的位点。随后连锁群的构建是通过Mapmaker/Exp（Version 3.0b）软件来完成，参数值的设置如下：两点分析的最小LOD值为3，最大重组值为0.3，三点和多点分析的最小LOD值为4，最大重组值为0.2，位点的连锁群拆分也是在LOD值为4，重组值不超过0.2的条件下进行的，采用软件中的"compare"、"order"、"ripple"功能来对处于同一连锁群上的位点进行合理的排序，用"map"命令计算出位点之间的重组值，通过kosambi函数转换为图谱距离。

2 结果与分析

2.1 家蚕SADF标记的多态性

用SADF对大造（♀）× C_{108}（♂）的 F_2 代69个个体扩增的结果，以图1为例加以说明，经选择碱基为CGA的引物扩增后电泳，得到28条带，片段大小为300～2 000 bp，出现了5个多态性片段，其长度大小依次为830 bp、730 bp、640 bp、480 bp和300 bp（依次命名为CGA 1.830，CGA 2.730，CGA3.640，CGA4.480，CGA5.300）。把所合成的40个引物全用于分子标记的筛选，总共得到993条扩增带，每一引物扩增所得片段数目平均为24.8条，能检测片段大小在100～2 000 bp。共得到127个多态性位点，占所观察到的总扩增带的12.8%，平均每个引物多态性条带数为3.2条。这40个引物的扩增结果都有多态性位点出现，至少1个，最多的有8个。所得到的127个多态性位点中有55个来自大造，72个来自 C_{108}。扩增带数在引物间差异不大，但多态性位点因其引物选择碱基不同而异。并且每个引物扩增带数与能产生的多态性带之间的相关系数是0.0211，不呈显著相关。这127个多态性位点经 χ^2 检测后，有78个位点符合3∶1的分离比，其中大造39个，C_{108} 39个。SADF标记中偏离孟德尔分离比例的异常分离位点（distorted segregation loci）占总数的38.6%。

2.2 家蚕RAPD标记的多态性

同样的用RAPD对大造（♀）× C_{108}（♂）的 F_2 代69个个体进行扩增的结果如图2所示，引物为F02，扩增后电泳，出现了3个多态性片段，1个来自大造，2个来自 C_{108}。片段大小为200～2 000 bp，多态性片段的长度大小依次为1 000、700、500 bp（依次命名为F021、F022、F023）。照此方式，用本实验室购买的425个RAPD随机引物分别在大造、C_{108} 以及 F_1 间进行多态性筛选扩增。其中有137个引物的扩增结果在两亲本间有多态性位点出现，比值为32.3%。在本RAPD试验中共得到586个多态性位点，平均每个引物有4.3位点。经 χ^2 检测后，有466个标记，符合3∶1的分离比（占总数的79.5%），其中大造253个，C_{108} 213个。

2.3 家蚕的分子连锁图

总合78个SADF标记和466个RAPD标记，用Mapmaker软件进行连锁分析，结果如图3。

（1）将292个来自大造，252个来自 C_{108} 的标记各自分为35个连锁群，大造的35个连锁群命名为a亚群，C_{108} 的35个连锁群命名为b亚群。在a亚群中有157个位点连锁，非连锁的位点有135个；在b亚群中有136个位点连锁，非连锁位点有116个。

（2）a亚群中各连锁群上标记数目变化范围在2～29个，连锁群的长度变化在8.2～239.6 cM，标记的平均图距为4.2～16.9 cM。平均图距小于10 cM的连锁群22个，大于10

cM 小于 20 cM 的连锁群有 13 个，35 个连锁群上位点平均数为 4.5 个，连锁群的平均长度为 27.4 cM。

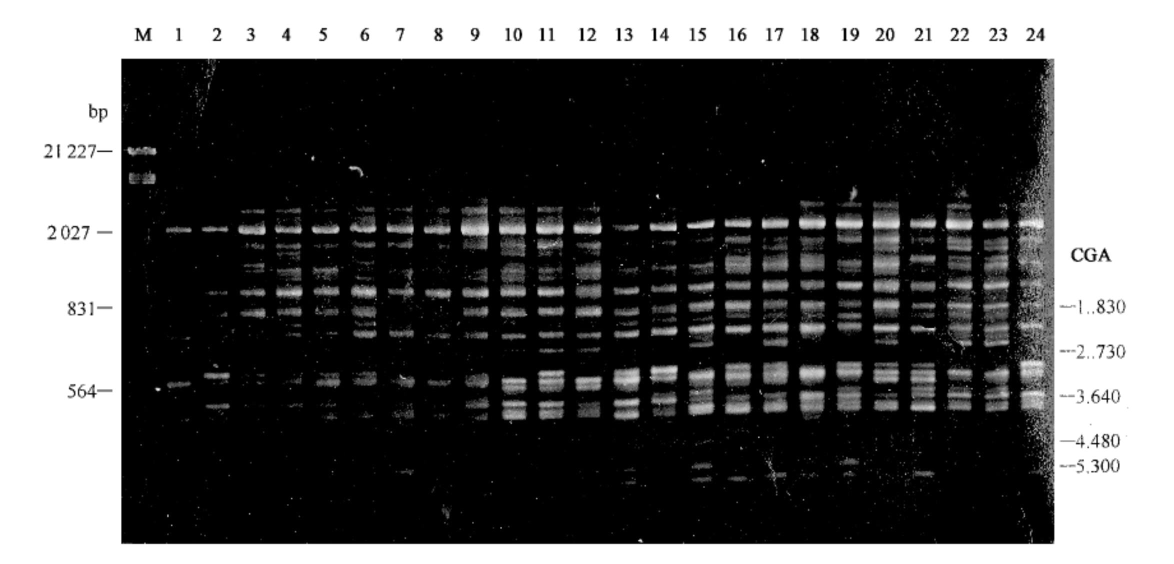


图 1　SADF 引物 16（选择碱基为 CGA）扩增的多态性片段在 F_2 代中的分离

Fig. 1　SADF that segregated in the F_2 generation（primer：16）

M：标准分子量（marker）λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ；

1～24：24 个 F_2 个体（24 F_2 intercross individuals）

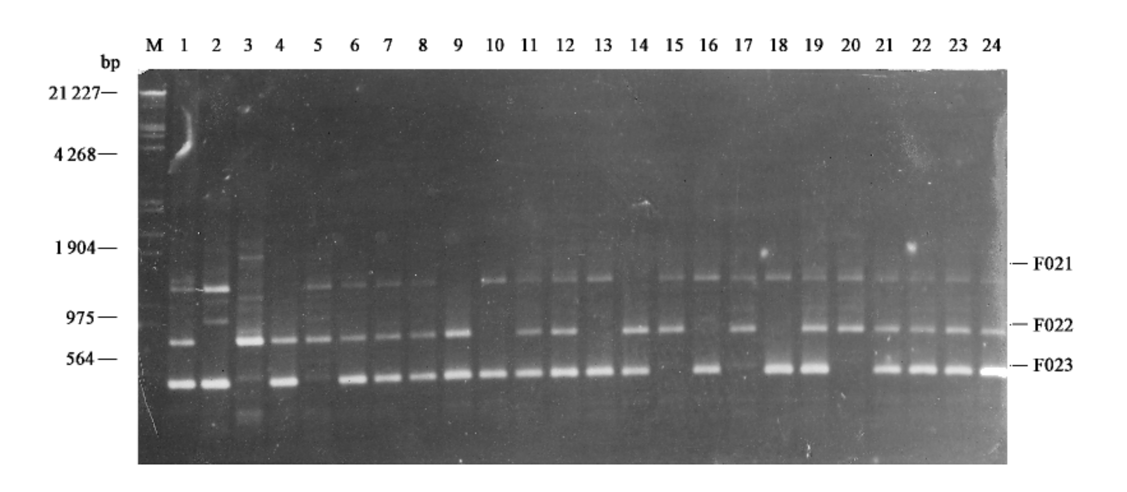


图 2　RAPD 随机引物 F02 扩增的多态性片段在 F_2 代中的分离

Fig. 2　RAPD that segregated in the F_2 generation（primer：F02）

M：标准分子量（marker）λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ；1：C_{108}；2：大造（Dazao）；

3～24：24 个 F_2 个体（3～24：F_2 intercross individuals）

（3）b 亚群中各连锁群上标记数目变化范围在 2～15 个，连锁群的长度变化在 3.7 ～ 193.2 cM，标记的平均图距为 3.2～26.0 cM。平均图距小于 10 cM 的连锁群有 12 个，大于

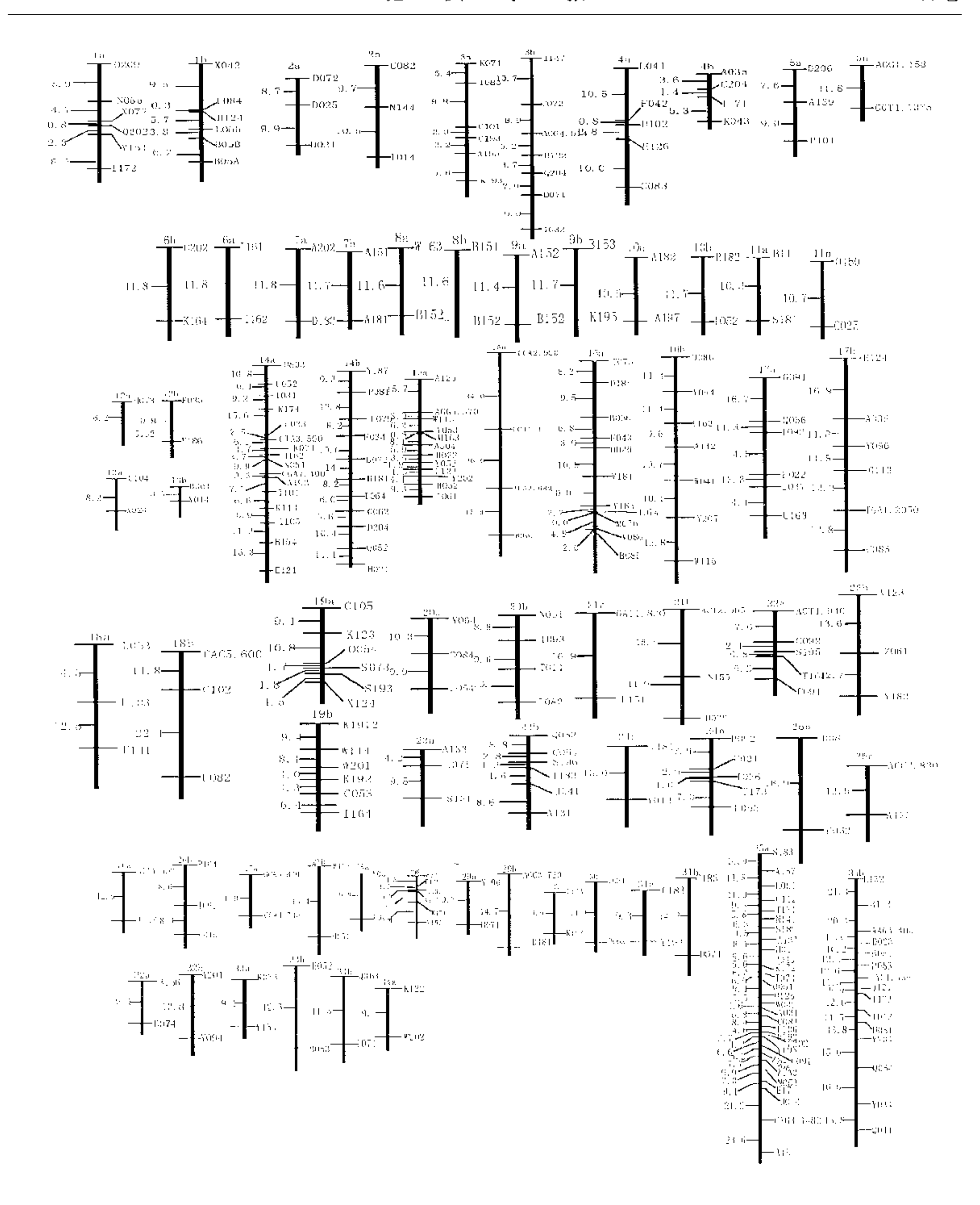


图3 家蚕的分子连锁图（大造×C_{108}为作图材料）

Fig. 3 Molecular linkage of silkworm (*Bombyx mori*) as derived from the cross Dazao × C_{108}

右边所示位点名称，左边所示图距

Number at the top indicate linkage groups. Loci are listed on the right and distances on the left

10 cM小于 20 cM 的连锁群有 22 个，25 个连锁群的平均图距为 26 cM，35 个连锁群上位点平均数为 3.9 个，连锁群的平均长度为 29.5 cM。

（4）a 亚群中 35 个连锁群的总长度为 959.1 cM，b 亚群为 1 033.3 cM，平均为 996.2 cM。

3 讨论

本研究首先对两种 DNA 多态分析方法（SADF 和 RAPD）进行了技术性探索，以保证获得 DNA 多态标记的稳定性和可靠性，然后才用这两种方法对同一杂交组合（大造♀ × C_{108}♂的 F_2 代）进行分析，获得多态标记进行连锁构图。SADF 分析获得的 DNA 多态率为 12.8%，略高于用 AFLP 来筛选大麦分子标记的比率 11.3%[8]，低于大豆的 36%（274/759）[9]和水稻的 22%（208/945）[10]；RADP 分析结果与 Ganachari 做家蚕 RAPD 时，每个引物能扩增出来的主带为 1 ~ 5 条，扩增片段长度范围为 200 ~ 3 000 bp[11]的结果较为一致；获得的 RADP 标记的比率为 32.3%，这高于 RAPD 引物在大造和 C_{108} 间所反映出的多态性高于豆类的 32%，小麦的 20%，稍低于 Promboon 等人所做家蚕的 40.6%（130/320）。

家蚕属于鳞翅目，具有雌完全连锁的特性，在遗传重组过程中我们不能决定两个处于互斥状态的标记在连锁群上的位置。例如当两个位点的关系如下 X-y/x-Y（X 与 Y 彼此连锁，x、y 又是 X 和 Y 各自的隐性基因），因为雌的完全连锁，双隐性 xy 不能在 F_2 个体中出现，于是我们不能够检测到任何重组子，也就是不能计算处于互斥的位点与位点之间的重组值。为了解决这个问题，Promboon 等[3]提出将用做连锁分析的分子标记先分为两个群，一群是全来自母本的位点（如本研究的 a 亚群），另一群是来自父本的位点（如本研究的 b 亚群），目前看来，这是对大造（♀）× C_{108}（♂）的 F_2 代作图群体解决雌完全连锁较为合理的方法。在家蚕分子连锁图的构建中，我们所进行的两种分子标记 SADF 和 RAPD 的筛选是在同一个作图群体中进行，并且两种标记都呈显隐性遗传方式。我们在实验室已经建立起的用 RAPD 方法筛选家蚕分子标记的基础上，之所以引入 SADF 法筛选分子标记，主要是想得到的标记能代表大部分的家蚕基因组，SADF 从基因组上筛选分子标记的位置与 *Pst* Ⅰ 的酶切位点有关，其涵盖信息量还有限，今后将设计更多酶切位点的引物进行 SADF 分析，以绘制密度更高的分子连锁图谱。这张家蚕分子连锁图 a、b 两亚群各有 35 个连锁群，共有 293 个分子标记分布其上，平均每个连锁图有 4.2 个标记，标记间的平均图距为 3.2 ~ 26.0 cM，是目前我国标记数目最多的分子连锁图。家蚕传统的形态连锁图总长度为 1 000 cM 左右，有 28 个连锁群，我们所构建的分子图在长度上与其较为接近。而连锁群的数目超过了 28，说明了某些连锁群之间相互是连锁的，只是我们目前缺乏特定的标记将它们整合在一起。因此，我们构建的 SADF 和 RAPD 标记连锁图还有待进一步完善。

参 考 文 献（References）

［1］ Goldsmith M R. A molecular map for the silkworm: constructing new links between basic and applied research. American Chemical Society Symposium series，1994，544：45 ~ 48

［2］ Goldsmith M R. The *Bombyx* genome mapping project. Sericologia，1991，21（Suppl.）：24 ~ 25

[3] Promboon A，Shimada T. Fujiwara H *et al*. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs in the silkworm，*Bombyx mori*. Genet. Res. Camb.，1995，66：1～7
[4] 何宁佳，鲁 成，周泽扬等. 利用SADF法进行家蚕基因组DNA多态性分析，生物物理与化学进展，1998，25（6）：563～565
[5] Sambrook J，Fritsch E F，Maniatis H. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. New York：Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，1989
[6] Williams J G K，Kubelik A R，Livak K J *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucieic Acids Res.，1990，18：6 531～6 535
[7] 夏庆友，周泽扬等. 家蚕RAPD的扩增条件，重复性及遗传模型研究. 蚕业科学，1996，22（1）：20～25
[8] Becker J，Vos P，Kuiper M *et al*. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol. Gen. Genet.，1995，249：65～73
[9] Maughan P J，Maroof M A S，Buss G R *et al*. Amplified fragment length polymorphism（AFLP）in soybean：species diversity inheritance，and near-isogenic line analysis. TAG，1996，93：392～401
[10] Maheswaran M，Subudhi P K，Nandi S *et al*. Ploymorphism，distribution，and segregation of AFLP markers in a double haploid rice population. TAG，1997，94：39～45
[11] Ganachari M，Nagaraju J *et al*. Genome fingerprinting of the silkworm，*Bombyx mori*，using random arbitrary primers. Electrophoresis，1995，16：1 663～1 668
[12] Yasukochi Y. A dense map of the silkworm，*Bombyx mori*，covering all chromsomes based on 1018 molecutar markers. Genetics，1998，150：1 513～1 525

Construction of a linkage map in the silkworm，*Bombyx mori*，based on SADF and RAPD markers

HE Ning-jia，LU Cheng，LI Bin，ZHOU Ze-yang，XIANG Zhong-huai
（Key Sericultural Laboratory of Agricultrual Ministry，College of Sericulture，Southwest Agricultural University，Chongqing 400716，China）

Abstract：544 DNA markers which were tested for the expected 3∶1 segregation by the chi-square test for 69 F_2 individuals were detected with 40 SADF synthetic primers and 137 RAPD primers. Using these DNA markers the linkage analysis was performed by Mapmaker/Exp（Version 3.0b）. The following parameters were preset：two-point analysis（LOD 3.0，maximum recombination value 0.3）；three-point and multi-point analysis（LOD 3.0，maximum recombination value no more than 0.2）. Linked markers were also identified at the “group” command with LOD score 4 and maximum recombination value 0.2. The functions of Mapmaker were employed to assess the order of the markers in each group. Recombination values were converted into map distance（centimorgan，cM）by applying the Kosambi function. A molecular linkage map of silkworm was constructed.

Key words：silkworm；DNA markers；linkage map；genetics